

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Henry Joseph Oduor Ogola
審 査 委 員	<div>主 査 澤 嘉 弘 (印)</div> <div>副 査 森 信 寛 (印)</div> <div>副 査 右 田 た い 子 (印)</div> <div>副 査 柴 田 均 (印)</div> <div>副 査 石 川 孝 博 (印)</div>
題 目	Insight on Dye-decolorizing Peroxidase Family (DyP-type Peroxidases) from the Molecular Analysis of a Novel Bacterial DyP from <i>Anabaena</i> sp. Strain PCC7120. (<i>Anabaena</i> sp. PCC7120株由来新規バクテリアDypの分子的解析から色素脱色型ペルオキシダーゼファミリーDyP・タイプペルオキシダーゼの見解)
査結果の要旨（2,000字以内）	
<p>高い酸化還元電位をもつアントラキノン染料（AQ）を効率的に酸化・脱色する能力から名づけられた色素脱色型ペルオキシダーゼ（DyP）はヘム含有ペルオキシダーゼの新規ファミリーであり、様々な担子菌と一部の細菌で同定されている。DyP は、古典的な植物ペルオキシダーゼと比較して、AQ に対する高い特異性、低い最適 pH、著しい活性部位の違い、ヘム結合モチーフの違い等から、注目を集めてきた。DyP の現在までの理解は、主に広範囲に特徴づけられた植物病原性真菌類 <i>Thanetophorous cucumeris</i> Dec1 株由来の DyP (Dec1 DyP)に基づいており、DyP ファミリーの他のメンバーの情報は未知のままである。特に、細菌由来の DyP の研究は、ゲノム情報に基づく自動翻訳された一次構造情報に限定されている。本研究は、さらなる新規 DyP・タイプ酵素の構造機能相関と潜在的応用性を理解するために、情報の乏しい細菌性の DyP に焦点をあて、光合成のラン藻 <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 ゲノムから、推定上の新規 DyP ホモログ（AnaPX）を同定し、クローン化し特徴づけたものである。</p> <p><i>Anabaena</i> sp. PCC7120 alr1585 は、ヘム依存型ペルオキシダーゼをコード化しており、真菌 DyP ホモログと相同性が高く Class D の DyP にグループ化された。精製リコンビナント酵素は、等電点 3.68、反応至適 pH 4.0、反応至適温度 35℃を持つ 53kDa の四量体タンパク質であった。AnaPX は、グアヤコル、4-アミノアンチピリン、ピロガロールなどの芳香族基質に広い特異性を示す、鉄プロトポルフィリン含有ヘムペルオキシダーゼであった。本酵素は Reactive Blue 5、Reactive Blue 4、Reactive Blue 114、Reactive Blue 119、Acid Blue 45 のようなアントラキノン（AQ）染料を効率的に脱色した。対照的に、アゾ染料(AZO)に対する AnaPX の脱色活性は、比較的低かったが、天然のレドックスメディエータの共存下で 2~50 倍と著しく加速された。特徴的であるのは、Dec1 DyP がグアヤコルより RB5 へ著しく高い活性を示すのに対して、AnaPX はグアヤコルと RB5 の両方へ高い活性を示すことである。これはヘム活性部位へのグアヤコル分子のアクセスしやすさが異なっていることに起因しているものと考えられる。水素供与体と合成染料に対する広い特異性と触媒効率、AnaPX が西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）や菌類の DyP のより良い代替物として有望であることを示している。</p>	

H₂O₂ に対する酵素安定性の改善のために、AnaPX 分子中の酸化を受けやすい 5 つの Met 残基を Ile、Leu または Phe で置換した部位特異的変異導入を行った。ヘム結合部位周辺のヘムキャビティ変異体が、著しい安定性の増加を示した。驚くべきことに、M401F と M451I は、100 mM の H₂O₂ で、それぞれ、16% と 5% の活性を保持した。加えて、5 mM の H₂O₂ で AQ と AZO への高い色素脱色活性を維持しており、野生型酵素(WT)よりヘム分解が遅いことが示された。AnaPX 安定化には、Met 残基の置換による、ヘムポケットの局所的な安定性の増加か、反応依存型自己不活化メカニズムの制限のいずれかが必要であることが示唆された。

DyP は、遠位のヒスチジンを持つ典型的な植物型ペルオキシダーゼとは対照的に、全く新しい GXXDG のモチーフを形成する遠位のアスパラギン酸塩残基を持っている。遠位 Asp204 の機能を解明するために、AnaPX Asp204 変異体を作製した。WT の Compound I 形成速度は D204H 変異体の約 100 倍速かった。D204H の His204 の pKa 値は、予想に反して 3.9 付近と WT より低かった。EPR 解析は WT AnaPX と D204H がタンパクラジカル種として非局在化する Compound I ラジカルを形成することを示唆した。D204H では、遠位 His と遠位 Arg との間で正荷電反発が起こり、安定な三者複合体を形成するための水素結合の形成が困難であるが、WT AnaPX では、遠位 Asp と遠位 Arg との間で静電的相互作用による中和が起こり、安定な三者複合体を形成することができる距離まで近づくことができると推察される。

以上、本学位論文は、AnaPX の構造と機能、とりわけ本酵素が持つユニークな反応特性と安定性の増強についての多くの新知見を含んでおり、この分野での研究の発展に大きく貢献することは間違いなく、学位論文として高く評価できると判断された。